

Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Preddiplomski studij biologije

Preddiplomski sveučilišni nastavnički studij biologije

Mariana Puškarić

Biokemijske metode u postupku dokazivanja procesa degeneracije u mozgu

Završni rad

Mentor: Prof. dr.sc. Elizabeta Has-Schön

Osijek, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Završni rad

Preddiplomski sveučilišni studij: Biologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Biokemijske metode u postupku dokazivanja procesa degeneracije u mozgu

Mariana Puškarić

Rad je izrađen: Zavod za biokemiju i ekofiziologiju biljaka

Mentor: Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön

Sažetak: Neurodegenerativne bolesti odnose se na oštećenja mozga koja u većini slučajeva izazivaju demenciju i smrt neurona. U radu su objašnjene metode kojima se neurodegeneracije mogu dokazati i pomoću kojih se istražuju. Metode su podjeljene na citogenetičke (*in situ* hibridizacija i fluorescentna *in situ* hibridizacija), imunohistokemijske (prepoznavanje ciljnih antigena pomoću određenih protutijela) i tehnike za vizualizaciju moždanog tkiva i aktivnosti moždanih stanica. Osim metoda za dokazivanje neurodegenerativnih bolesti, opisani su i biomarkeri neurodegeneracije i bolesti povezane s degeneracijom moždanog tkiva. Neke od bolesti su Alzheimer-ova bolest, Tay-Sach-ova bolest, Huntington-ova bolest, Parkinson-ova bolest i amiotrofična lateralna skleroza.

Broj stranica: 22

Broj slika: 9

Broj literaturnih navoda: 40

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: neurodegeneracija, neurodegenerativne bolesti, metode, biomarkeri

Rad je pohranjen u: knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Bachelor's thesis Department of Biology

Undergraduate studies in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

Biochemical methods in the procedure of demonstrating the process of degeneration in the brain

Mariana Puškarić

Thesis performed at: Department of Biochemistry and Ecophysiology of plants

Supervisor: Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön

Abstract: Neurodegenerative diseases are associated with damage to the brain, which in most cases cause dementia and death of neurons. In this work we consider the methods used to prove neurodegeneration and by which they can be explained. The methods are divided into cytogenetic methods (*in situ* hybridization and fluorescent *in situ* hybridization), immunohistochemical methods (recognition of target antigens by specific antibodies) and techniques for the visualization of brain tissue and brain-cell activity. In addition to methods for the detection of neurodegenerative diseases, here is also described the neurodegeneration biomarkers and disease associated with degeneration of the brain tissue. Some of the diseases are Alzheimer's disease, Tay-Sach's disease, Huntington's disease, Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis.

Number of pages: 22

Number of figures: 9

Number of references: 40

Original in: Croatian

Keywords: neurodegeneration, neurodegenerative diseases, methods, biomarkers

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek and in National university library in Zagreb in electronic form. It is also available on the web site of Department of Biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

SADRŽAJ RADA

1. Uvod.....	1
2. Osnovni dio.....	2-17
2.1. Metode dokazivanja neurodegeneracije.....	2
2.1.1. Prikupljanje uzoraka za analizu.....	2
2.1.2. Metode analize uzoraka.....	2-3
2.1.2.1. Citogenetičke metode.....	3-6
2.1.2.2. Imunohistokemijske metode.....	6
2.1.2.3. Tehnika za vizualizaciju moždanog tkiva i aktivnosti moždanih stanica.....	7-11
2.2. Biomarkeri neurodegeneracije.....	12-13
2.3. Bolesti povezane sa degeneracijom moždanog tkiva.....	13
2.3.1. Alzheimer-ova bolest.....	13-14
2.3.2. Tay-Sach- ova bolest.....	14-15
2.3.3. Huntington-ova bolest.....	15
2.3.4. Parkinson-ova bolest.....	15-16
2.3.5. Amiotrofična lateralna skleroza.....	17
3. Zaključak.....	18
4. Literatura.....	19-22

1. UVOD

Proces progresivnog gubitka strukture i funkcije neurona, uključujući i smrt neurona nazivamo neurodegeneracija. Mnoge bolesti, kao što su multipla skleroza, Parkinson-ova, Alzheimer-ova i Huntington-ova bolest, nastaju kao posljedica neurodegenerativnih procesa ^[1]. Dosadašnja istraživanja otkrila su međusobne sličnosti ovih bolesti, vidljive na staničnoj razini.

Pronalaženje uzroka neurodegenerativnog poremećaja prvi je korak u otkrivanju patološkog mehanizma koji uzrokuje neurodegeneraciju. Zahvaljujući napretku u genetici, biokemiji, molekularnoj biologiji i vizualizacijskim tehnikama, znanstvenici su otkrili određene specifičnosti mehanizama i određene proteine koji su identični kod različitih neurodegenerativnih bolesti. Postoji genetički uvjetovan rizik razvoja tih bolesti za koje je karakteristično nakupljanje različitih proteina i brojnih toksičnih molekula (slobodnih radikala) u određenim područjima mozga, koji oštećuju moždane stanice koje zatim polako propadaju. S obzirom na progresiju bolesti uzroci demencije mogu se podijeliti u kronične progresivne i neprogresivne encefalopatije ^[2]. Kronične neprogresivne encefalopatije nastaju obično uslijed ozljeda ili hipoksije, te rezultiraju neprogresivnom demencijom. U metaboličke uzroke kronične progresivne encefalopatije ubrajaju se različita toksička stanja (sistemske infekcije, alkoholizam, predoziranje droga, trovanja teškim metalima i organskim otapalima), deficijencija vitamina B12, B1, B2, niacina, kronična hepatička, renalna i kardiorespiratorna encefalopatija i endokrini poremećaji ^[3].

Poremećaje ponašanja koji nastaju kao posljedica demencije treba promatrati kroz načela anatomsko-funkcionalne korelacije zahvaćenih dijelova mozga i neuropsihološkog statusa bolesnika ^[4]. Područja mozga pogođena neurodegenerativnim procesima gotovo nikad nisu u potpunosti uništena, već postoji različit stupanj selektivnosti s obzirom na tipove neurona i njihov anatomske smještaj. Ne postoji "tipična demencija", već svakog dementnog bolesnika treba promatrati individualno ovisno o osobnosti prije nastanka demencije.

Usavršavanje postojećih i razvijanje novih metoda koje omogućavaju razumijevanje i liječenje neurodegenerativnih poremećaja predstavlja jedno od najvećih izazova u području biokemije. Istraživanja procesa neurodegeneracije pružaju temelje za razvoj terapija kojima bi se ublažio razvoj mnogih bolesti. Procesi neurodegeneracije dokazuju se različitim metodama poput imunohistokemije i funkcionalnih vizualnih metoda. U ovom radu opisane su različite metode koje se trenutno koriste u istraživanju različitih aspekata neurodegeneracije.

2. OSNOVNI DIO

2.1. Metode dokazivanja neurodegeneracije

Istraživanjem staničnog i molekularnog patofiziološkog mehanizma neurodegeneracije dobivamo temelj za razvoj učinkovite terapiju. Kako bi se mogla provesti istraživanja o navedenim mehanizmima, potrebno je osmisлити i koristiti eksperimentalne modele (*in vitro* i *in vivo*). Istraživanja u području neurobiologije najčešće se provode na životinjama (miševima i štakorima). Kako bi razumijeli mehanizam neke neurodegenerativne bolesti, prvo ju moramo dokazati i odrediti u kojem stupnju je bolest razvijena. U svrhu dokazivanja neurodegeneracije koriste se različite metode, ovisno o cilju kojeg želimo postići.

2.1.1. Prikupljanje uzoraka za analizu

Nakon provedenog eksperimenta na živim modelima ili prikupljanja potrebnih životinja one se anesteziraju korištenjem izoflurana, nakon čega se obavlja transkardijalna perfuzija. U trenutku duboke anestezije životinje (disanje plitko i sporo) uvodi se igla za perfuziju u lijevu klijetku srca. Prereže se desna predklijetka i lagano se ubrizga 1×PBS-a. Postupak se ponavlja dok 1×PBS u potpunosti ne zamjeni krv (jetra prolijeđi). Nakon potpunog ispiranja krvi, kroz istu iglu ubrizgava se 4%-tnog paraformaldehida (PFA), pH=7.4. Indikator uspješno napravljene perfuzije je potpuna ukočenost tijela životinje. Nakon perfuzije obavlja se disekcija cijelog mozga, koji se pohranjuje u 4%-tni PFA na 24h. Nakon završene fiksacije, mozak se prebacuje u rastuće koncentracije otopinu saharoze kroz 72h. Krioprotektirani mozak brzo se smrzava u izopentanu i pohranjuje na -80° C do analize. Ukoliko je za analizu potreban svježije zamrznuti mozak, mozak se nakon disekcije odmah zamrzava u tekućem dušiku. Isto vrijedi i za ostale organe potrebne unutar istraživanja.

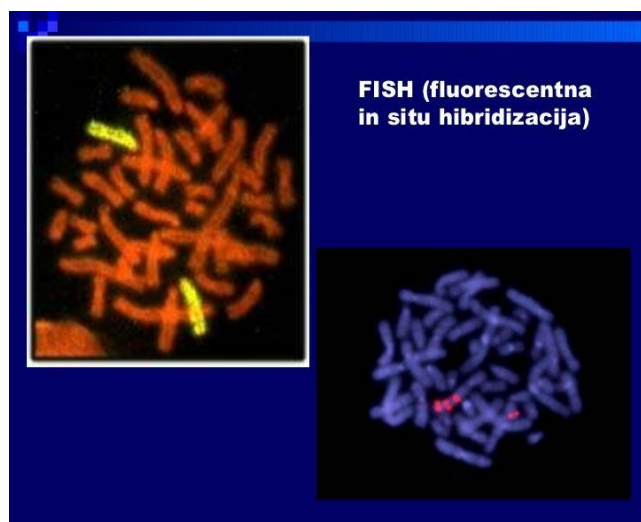
2.1.2. Metode analize uzoraka

Najčešće metode korištene u neurobiološkim znanstvenim istraživanjima su citogenetičke i imunohistokemijske. Baziraju se na detekciji nukleinskih kiselina i pronalasku specifičnih antigena kako bi se odredile specifične ciljne sekvence i ciljni antigeni. Konvencionalne metode molekularne biologije omogućavaju da se ocijeni ekspresija gena. Te metode uključuju Southern blot, Northern blot, PCR, RNA-znu i *in situ* hibridizaciju. Od mnogih novih doprinosa u tehnologiji baziranoj na genomima, analiza DNA čipom (eng.

microarray assay) se pojavila kao jedna od bitnijih i efektivnih alata za pristup transkripcijskim razinama u raznim sistemima paradigama ^[5] .

2.1.2.1. Citogenetičke metode

Tehniku koja omogućava detekciju nukleinskih kiselina odnosno detekciju specifičnih ciljnih sekvenci unutar stanice uz istovremeno očuvanje stanične i tkivne morfologije nazivamo *in situ* hibridizacija (ISH). Zasniva se na principu komplementarnosti, tj. denaturirana proba se hibridizira točno na komplementarnu ciljnu sekvencu nukleinske kiseline, DNA ili RNA ^[6]. Kao proba koristi se kratki segment nukleinske kiseline, obilježen nekom fluorescentnom bojom (npr. kod FISH-a) i komplementaran je ciljnoj sekvenci koja se želi detektirati. Obilježavanje probe provodi se kako bi mogli točno odrediti njezinu lokaciju i količinu ciljne sekvence. Od ISH metoda najčešće se koriste fluorescentna *in situ* hibridizacija (FISH) i kromogena *in situ* hibridizacija (CISH). Glavna razlika između FISH-a i CISH-a je način na koji se vizualiziraju signali proba (kod FISH-a se vizualizira preko fluorokroma, a kod CISH-a se koriste kromogeni). ISH metoda se koristi direktnim (probe obilježene fluorokromom) i indirektnim obilježavanjem (probama obilježenim biotinom i digoksigenima). CISH daje najbolje rezultate sa indirektnim obilježavanjem veznog mjesta probe. Fluorokromi imaju veću osjetljivost, spektralnu fleksibilnost i bolju rezoluciju nego kromogeni, pa je isto tako i veličina probe za CISH veća. FISH se koristi za određivanje broja kopija određenog gena, a FISH kitovi (eng. *dual color*) obično imaju probu specifičnu za gen i kontrolnu centromernu probu obilježene različitim fluorokromima ^[7].



Slika 1. Slika dobivena FISH *in situ* hibridizacijom (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://www.slideshare.net/ljubichica/jedro>)

Kao biomarker neurodegenerativne bolesti možemo primijeniti i promijenjenu ekspresiju microRNA u raznim stadijima bolesti, uključujući neurodegeneraciju zajedno sa aplikacijom miRNA u biološkim fluidima u raznim patologijama. miRNA može se transportirati preko eksosoma (male membranske vezikule koje izlučuju različiti tipovi stanica, npr. neuroni, astrociti, oligodendrociti i mikroglije). Eksosomi se odvajaju od stimuliranih krvnih stanica i vaskularni endotelium je uključen u neurološke poremećaje ^[8]. Mogu se izolirati iz biofluida kao što su krv ili urin, čime su još dostupniji za upotrebu u dijagnostici.

Kako bi se došlo do rezultata, mora se proći prvo nekoliko koraka u kojima se provodi analiza RNA molekule i PCR amplifikacija.

A) Uzimanje RNA

1. Očuvanje RNA

Izvori za RNA amplifikaciju su svježje, zamrznuto i fiksirano tkivo. RNA vrste su izuzetno osjetljive na degradaciju RNA-om. RNA-ze su izuzetno stabilne i zadržavaju svoju aktivnost u širokom spektru pH vrijednosti.

2. Regionalna analiza tkiva

Regionalna analiza koristi se za određivanje transkripta koji se nalazi u organu, lamini ili nukleusu. Transkript se razlikuje od odvojenih ili povezanih regija i sadrži kombinaciju različitih tipova stanica koji sačinjavaju tu regiju. Dijelovi mozga mogu se vješto razdvojiti od svježih ili smrznutih tkiva. RNA se ekstrahira pomoću kemijske ili magnetske ekstrakcije. Prednost regionalne analize je ta da je RNA obilna i razlike između regija se mogu prepoznati bez skupih metoda, a nedostatak je taj da u regionalnoj analizi nedostaje rezolucija na razini jedne stanice, kao npr. epitelnih stanica, neurona, vaskularnih elemenata i slično ^[9].

3. Analiza na razini jedne stanice

Analize na razini jedne stanice i jedne populacije stanica omogućavaju analizu individualnih tipova stanica (može se analizirati ekspresija neurona). Neuroni koji u tom trenutku nisu bili eksprimirani identificiraju se pomoću histokemijskih metoda. Mikrodisekcija je metoda dobivanja individualnih stanica ili populacija identičnih stanica koja omogućava ekspresijsko profiliranje koristeći mikro platforme bazirane na PCR-u.

B) PCR amplifikacija

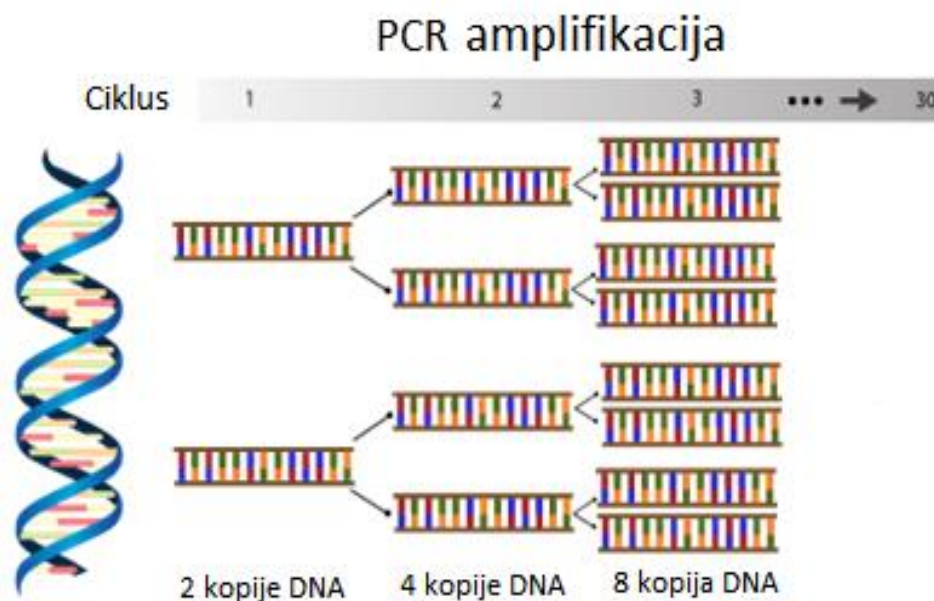
PCR reakcija (eng. *Polymerase Chain Reaction*) je metoda kojom se relativno kratki dio DNA umnožava u veliki broj identičnih kopija. Koristi se u mikrobiologiji, virologiji, dijagnostici nasljednih bolesti, neoplastičnih i malignih bolesti ^[10]. PCR amplifikacija radi na vrlo jednostavan način. Ciljni dio DNA molekule koju se želi umnožiti obilježavamo kratkim oligonukleotidnim sekvencama (početnicama), koji su komplementarni krajevima ulomka DNA od interesa. Početnice pokreću seriju reakcija pomoću enzima DNA polimeraze, koja na kalupu jednog lanca DNA sintetizira novi, komplementarni lanac. Polimerazna lančana reakcija odvija se u uređaju koji automatski mijenja temperaturu reakcije, ovisno o potrebama eksperimenta. Isti uređaj zagrijava i hladi reakcijsku smjesu u epruветama (0,2 ml) koje se nalaze u termobloku ^[11].

Osnovni parametri svih PCR protokola su:

1. Inicijalno denaturiranje DNA u trajanju od 3 do 5 minuta na temperaturi od 94°C. Pritom se razdvajaju spareni lanci DNA koji služe kao kalupi za amplifikaciju
2. Hibridizacija početnica na komplementarne odjeljke DNA (eng. *annealing*). U tom procesu temperatura se snižava na prosječno 55°C da bi se oligonukleotidne početnice vezale na komplementarne razdvojene lance DNA.
3. Sinteza komplementarnog lanca (eng. *extension*) na temperaturi od 72°C.

Ta temperatura je optimalna za djelovanje Taq-polimeraze koja ugrađuje nove komplementarne nukleotide sve dok ne dođe do druge početnice. Pošto se na oba lanca odvija sinteza, u jednom ciklusu amplifikacije dolazi do udvostručenja DNA molekule. Daljnje povećanje broja DNA molekula odvija se geometrijskom progresijom (1, 2, 4, 8, 16, 32, 64).

Protokol se ponavlja 30 do 40 puta. Nakon 40 ciklusa pojavljuje se tzv. „fenomen platoa“, kada dolazi do zasićenja (ili potroška reaktanata), tako da se gubi efikasnost reakcije ^[12].



Slika 2. Postupak umnožavanja DNA molekule PCR amplifikacijom (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://www.gmotesting.com/Testing-Options/Genetic-analysis>)

2.1.2.2. Imunohistokemijske metode

Kod imunohistokemijskih metoda dolazi do lokalizacije specifičnih antigena u tkivu, pomoću ciljno usmjerenih protutijela, tako da se određeno protutijelo veže i prepoznaje samo ciljni antigen ^[13]. Imunohistokemijske metode koriste se kako bi se procijenili odgovarajući stanični markeri koji definiraju određeni fenotip, što omogućava dobivanje važnih informacija. Dobivene informacije važne su za klasificiranje i diferenciranje bolesti. Osim u dijagnostičke svrhe imunohistokemija se također koristi i u znanstveno-istraživačke svrhe da bi se bolje razumjela distribucija i lokalizacija biomarkera i ekspresija pojedinih proteina u različitim tkivima. Antigeni u tkivu se mogu imunohistokemijski detektirati na dva načina, direktnom ili indirektnom metodom. Kod direktne metode koristimo označeno protutijelo (ima vezanu alkalnu fosfatazu ili peroksidazu) koje reagira sa ciljnim antigenom. Koristi se samo jedno protutijelo, tako da je postupak brz i jednostavan. Kod indirektno metode prvo se primarno protutijelo veže na ciljno mjesto, a potom se sekundarno protutijelo veže na primarno protutijelo. Nakon bojanja, promjene u tkivu se prate mikroskopski i tako se omogućava dijagnosticiranje određenih neurodegenerativnih bolesti. Zbog korištenja sekundarno protutijela, koje pojačava signal, ova metoda je osjetljivija.

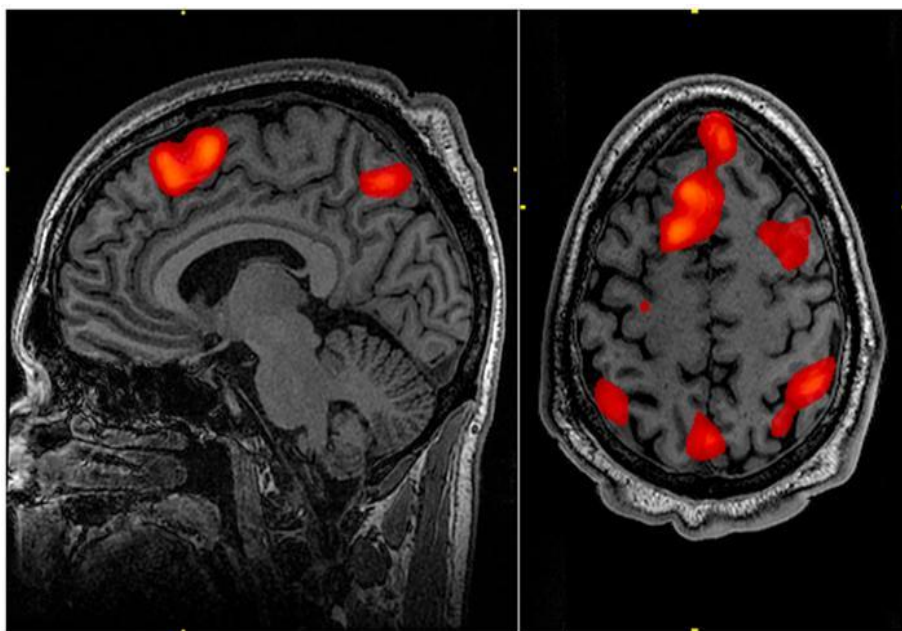
2.1.2.3. Tehnike za vizualizaciju moždanog tkiva i aktivnosti moždanih stanica

Za vizualizaciju tkiva i aktivnosti moždanih stanica koristimo strukturalne i funkcionalne testove. Kod strukturalnih metoda dobivamo slikoviti i kompjuterizirani prikaz dijelova mozga kojeg promatramo koristeći različita skeniranja. Funkcionalne metode baziraju se više na moždane potencijale (slušni, vidni...) i mjerenja moždane aktivnosti.

A) Strukturalni testovi

fMRI

MRI-skenovi mozga koriste jako magnetsko polje. Još jedno magnetsko polje, tj. gradijent polja, tada se primjenjuje za prostorno lociranje različitih jezgara. Konačno, radiofrekvencijski puls (RF) šalje jezgre na više razine magnetiziranja, ovisno o tome gdje se nalaze. Kada je RF polje uklonjeno, jezgre se vraćaju u početno stanje, a energija koju emitiraju se mjeri sa zavojnicom za ponovno pozicioniranje jezgre. MR na taj način osigurava statički strukturni pogled moždane tvari. 1890. godine otkriveno je da su promjene u protoku krvi i krvna oksigenacija mozga povezane s neuronskom aktivnosti. Kada su neuroni aktivni, povećava se protok krvi u područjima mozga gdje se neuroni nalaze. Dolazi do zamjene deoksigenirane krvi oksigeniranom, što tada može trajati oko 2 sekunde. Deoksigenirani hemoglobin je više magnetičan (paramagnetičan) nego oksigenirani hemoglobin, koji je gotovo otporan na magnetizam (diamagnetičan). Razlika u magnetičnosti oksigeniranog i deoksigeniranog hemoglobina dovodi do stvaranja poboljšanog signala MR-a, jer diamagnetska krv manje ometa magnetsko MR signalno polje. Promjenu singla MR-a uvjetovanu neuronskom aktivnosti još nazivamo i hidrodinamičkim odgovorom (eng. *BOLD effect*)^[14].



Slika 3. Slika dobivena funkcionalnom magnetskom rezonancom (fMRI) (Slika preuzeta i preuređena sa <http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/46484/title/Faulty-Statistics-Muddy-fMRI-Results/>)

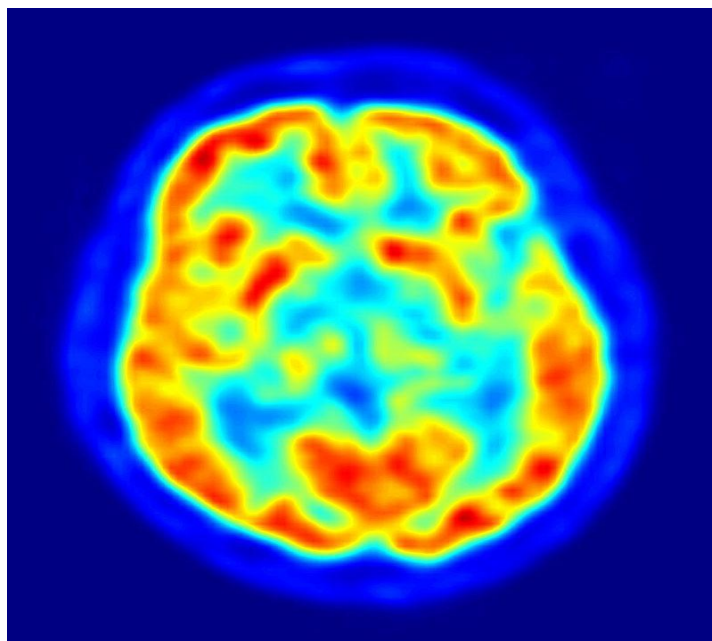
PET/CT

PET/CT (pozitronska emisijska tomografija/kompjutorizirana tomografija) je dijagnostička metoda kojom se pomoću radiofarmaka prikazuje funkcija tkiva i organa, odnosno metabolizam i stupanj metaboličke aktivnosti stanica ^[15]. Najčešće se PET/CT metoda koristi za praćenje bolesnika s različitim vrstama malignih tumora. Također je i najosjetljivija molekularna slikovna metoda. Skeniranje ovom metodom obuhvaća cijelo tijelo bolesnika pomoću čega možemo odrediti stupanj proširenosti i aktivnost bolesti. Omogućuje nam da pratimo i procjenjujemo napredak same bolesti, povratak primarnog tumora ili zaostalog tumorskog tkiva nakon operacije. Dakle, PET/CT metodom možemo vidjeti da li je operativno u potpunosti uklonjen tumor i kako teče kemoterapija i pokazuje li se djelotvornom, što znatno utječe na učinak liječenja ^[16]. Za slikovni prikaz se najčešće koristi radiofarmak F-18- FDG (radioaktivnim izotopom fluora obilježena fluorodeoksiglukoza), koji se injicira intraveniozno te prikazuje metabolizma glukoze u stanicama. Uvidom u metabolizam glukoze možemo odrediti aktivnost maligne bolesti. Osim FDG-a mogu se koristiti i neki drugi radiofarmaci specifični za druge tumore. Uz PET metodu skeniranja, sastavni dio pretrage je i CT (kompjutorizirana tomografija). To je dijagnostička metoda tijekom koje se snimani dio tijela izlaže rentgenskom zračenju, što omogućuje detaljan

anatomski prikaz kosti, mekih tkiva i krvnih žila. CT niske rezolucije, koji prvenstveno služi u tehničke svrhe. Koristi se za korekciju PET snimaka i za određivanje točne anatomske lokalizacije lezija, tkiva i organa u kojima PET pokazuje aktivnosti. Postoji i dijagnostički CT uz primjenu oralnog i intravenskog kontrastnog sredstva (prikaz arterijske i venske faze). Procjena PET/CT nalaza je kvalitativna i vizualna. Opisuju se područja s pojačanim ili patološkim nakupljanjem radiofarmaka. Iz podataka o težini, visini, površini tijela bolesnika i danoj dozi radiofarmaka izračuna se SUV (eng. *standardised uptake value*, tj. standardizirani iznos nakupljanja aktivnosti) koji je onda i glavni parametar kod praćenja učinka terapije i liječenja. Procjenjuje se razlika u vrijednosti SUV-a navedena u nalazu koji je napravljen prije liječenja i vrijednost SUV-a na kontrolnom nalazu. Kako bi zaključili da je liječenje učinkovito, izračuna SUV-a mora biti manji od onog dobivenog na prvom ^[17]. PET/CT se kod neurodegenerativnih bolesti koristi za mjerenje cerebralnog metabolizma glukoze i praćenje određenih biomarkera (β -amiloidni proteini i tau-proteini), što pomaže ranom otkrivanju bolesti i liječenju.



Slika 4. PET scan uređaj (Slika preuzeta sa <http://www.nhs.uk/Conditions/PET-scan/Pages/Introduction.aspx>)



Slika 5. Slike dobivene PET/CT skeniranjem mozga (Slika preuzeta sa https://sr.wikipedia.org/wiki/Pozitronska_emisiona_tomografija)

B) Funkcionalni testovi

Evocirani moždani potencijali

Evocirani potencijali predstavljaju bezbolnu funkcionalnu elektrofiziološku metodu u kojoj se ispituje odgovor živčanog sustava na ponavljane podražaje, koji se registrira elektrodama postavljenim na tijelu i glavi. Postoje tri modaliteta evociranih potencijala za ispitivanje osjetnih sustava, a to su VEP (vidni evocirani potencijali), BAEP (slušni evocirani potencijali) i SSEP (somatosenzorni evocirani potencijali). Proučavajući dobivene podražaje možemo otkriti boluje li ispitana osoba od neke neurodegenerativne bolesti. ^[18]

1. VEP (vidni evocirani potencijali) je neurofiziološka tehnika ispitivanja vidnog puta. Ispitivanje se vrši stimulacijom vidnog puta strukturiranim vidnim podražajem-šah pločom prikazanom na TV ekranu. Odgovor registriraju elektrode postavljene na glavi na tipičnim mjestima. Ispituju se oba oka pojedinačno, višestrukim ponavljanim stimulacijama ^[19].

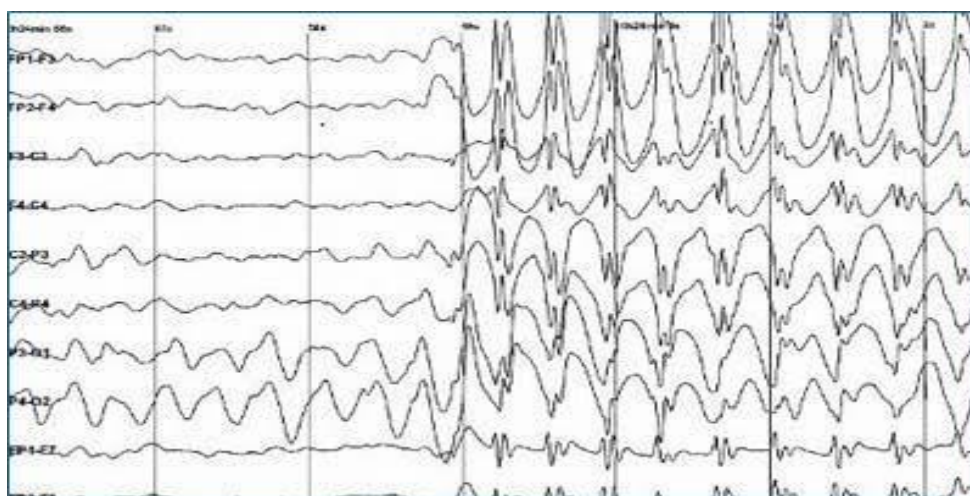
2. BAEP (slušni evocirani potencijali) je neurofiziološka tehnika ispitivanja slušnog puta. Koristi se u dijagnostici i praćenju bolesti oštećenja perifernog i centralnog dijela slušnog puta. U neurološkoj praksi ispituju se slušni evocirani potencijali kratke latencije (do 10 ms) koji se generiraju u moždanom deblu. Stimuliranje radimo tako da se putem audioslušalica

putšta tonski klik, ponavljajući ga nekoliko puta. Tijekom ispitivanja prvo određujemo prag sluha, na svakom uhu zasebno. Odgovor se dobije putem elektroda postavljenih na glavi, na tipičnim mjestima ^[20].

3. SSEP (somatosenzorni evocirani potencijali) je neurofiziološka tehnika ispitivanja osjeta dodira. Koristi se za praćenje bolesti uzrokovanih oštećenjem leđne moždine i mozga. Stimuliranje se vrši ponavljanim električnim stimulansa putem površinske elektrode postavljene iznad mješovitog perifernog živca na tipičnim mjestima na ruci ili nozi. Odgovor se registrira elektrodama postavljenim na tipičnim mjestima na tijelu i glavi ^[21].

EEG

Elektroencefalograf (EEG) je metoda mjerenja električke moždane aktivnosti. Naponi mozga registriraju se depolarizacijom i repolarizacijom neuronskih stanica mozga. Za dijagnozu neke bolesti važna je registracija napona mozga na različitim dijelovima mozga. Mogu se registrirati psihička stanja i neoplazme. Prilikom mjerenje se koristi 19 elektroda (+2 uzemljenja na uškama) na glavi. Za registraciju se koristi 8, 12, 18, 24, 32 kanalni EEG uređaj. Kanal je isto što i odvod, odnosno pojačalo s elektrodama. Mjerenja mogu biti bipolarna i monopolarna. U EEG-u se mogu uočiti karakteristični signali: delta, theta, alpha, beta, gamma. Osjetilno motorički izvodi se slično EKG snimanju. Pacijentu se postavljaju elektrode na glavu u vidu tzv. kape, kojom su vezani za kompjuterizirani aparat tzv.elektroencefalograf, koji vrši obradu registriranih signala odnosno valova sa poglavine pacijenta ^[22].



Slika 6. EEG mjerenje (Slika preuzeta sa

<https://sites.google.com/site/ljudskimozakbiologija/snimanja-mozga>)

2.2. Biomarkeri neurodegeneracije

Biomarkeri su vrlo važni pokazatelji normalnih i abnormalnih bioloških procesa. Dobar biomarker treba biti precizan i pouzdan, te mora imati mogućnost razlikovanja različitih stanja bolesti. Smatra se da ti pokazatelji imaju veliki potencijal u predviđanju mogućnosti za razvoj bolesti, pomaganje u ranoj dijagnostici i postavljanje standarda za razvoj novih lijekova za liječenje bolesti. Nove tehnologije omogućile su znanstvenicima da identificiraju biomarkere nekoliko različitih neurodegenerativnih bolesti. Samo neki od mnogih novih biomarkera koji su nedavno identificiran su: fosforilirani tau proteini, β -amiloidni izooblicima Alzheimerovu bolest (AD) i fosforilirani tau proteini.

1. β -Amiloidni izooblici

Otkriće da se beta amiloid producira tijekom normalnog staničnog metabolizma i da se izlučuju u cerebrospinalnu tekućinu se iskoristilo kao baza za razvoj beta amiloidnih biomarkera ^[23]. Iduće otkriće, da je β -amiloid 42. Najzastupljeniji oblik koji se nalazi u stanici tijekom bolesti je omogućilo da se razvije test za ovaj konkretni izooblik koristeći metodu ELISA. Kao biomarker koristi se za rano otkrivanje Alzheimer-ove bolesti.

2. Tau protein

Postoji nekoliko različitih izooblika tau proteina u cerebrospinalnoj tekućini, a i sama molekula ima brojne fosforilirajuće strane. Najčešće korištena ELISA za T-tau protein se bazira na monoklonalnim antitijelima koji detektiraju sve izooblike tau proteina neovisno o stanju fosforiliranosti. Brojna istraživanja su koristila ovu metodu i dokazala značajan porast T-tau u cerebrospinalnoj tekućini tijekom Alzheimer-ove bolesti ^[24].

3. Fosforilirani Tau protein

U najčešće korištenoj ELISA metodi za određivanje P-tau u cerebrospinalnoj tekućini koriste se antitijela koja su specifična za fosforiliranje na treoninu 181 ili treoninu 231. Također su istraživanja pokazala povišenu razinu proteina u cerebrospinalnoj tekućini u slučaju Alzheimer-ove bolesti ^[25].

4. Kombinacija Tau i β -amiloida kao biomarkera

Nekoliko istraživanja pokazalo je da je vjerodostojnost dijagnostike izuzetno viša ako se kombinira detekcija T-Tau, p-tau i β -amiloida 42 nego spomenutih markera posebno. U

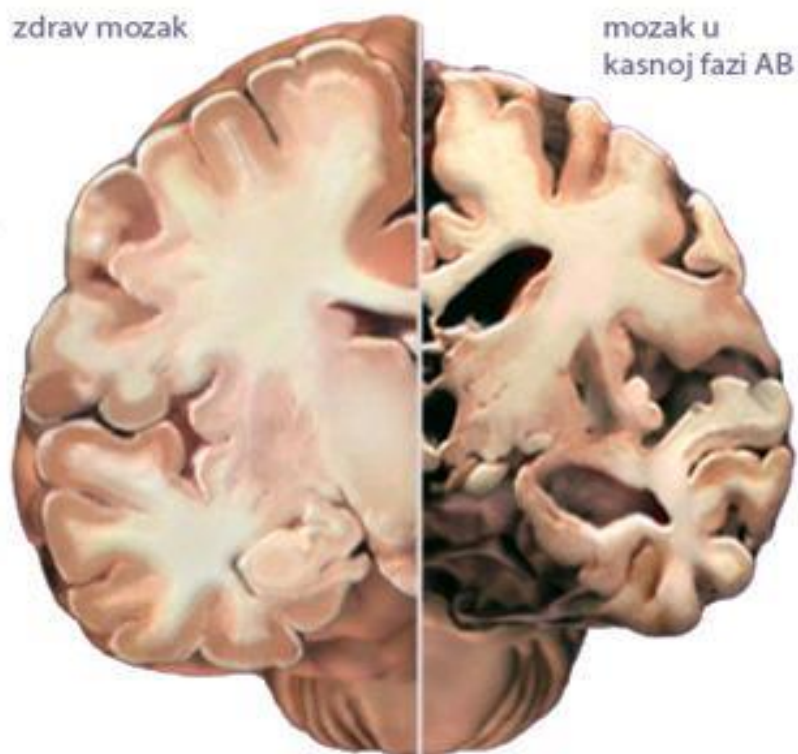
skladu s time, bilo je potrebno pronaći metodu koja će obuhvatiti detekciju sva 3 markera, a to su Luminex metoda i ELISA metoda koje svaka imaju svoje razlike, ali se obje koriste u istoj mjeri.

2.3. Bolesti povezane sa degeneracijom moždanog tkiva

Neurodegenerativne bolesti uzrokuju propadanje mozga i odumiranje živčanih stanica tijekom vremena. Neke neurodegenerativne bolesti, kao što je Alzheimer-ova bolest, razvijaju se starenjem, te utječe na promjenu ponašanja i pamćenje. Ostale bolesti, kao što su Tay-Sachs-ova bolest, genetski su izazvane i razvijaju se u ranoj dobi. Druge česte neurodegenerativne bolesti su Huntingtonova bolest, amiotrofična lateralna skleroza, Parkinsonova bolest te svi oblici demencije. Uobičajeni simptomi neurodegenerativnih bolesti su gubitak pamćenja, apatija, anksioznost, agitacija i promjene raspoloženja. Novi simptomi bolesti razvijaju se kako sama bolest napreduje. Lijek za neurodegenerativne bolesti nema, a bolesnicima pomažu razne metode liječenja koje nastoje smanjiti napredovanje simptoma i održati kvalitetu života ^[26].

2.3.1. Alzheimer-ova bolest

Najčešći oblik demencije je Alzheimer-ova bolest. Izraz „presenilna demencija“ koristio se kao naziv za AD, a isto tako postojao je i izraz „senilna demencija“ koji se koristio za opisivanje demencije u starijih osoba. Danas se ti izrazi ne koriste jer je poznato da se AD može pojaviti u bilo kojoj dobi poslije 30.-te godine života (najmlađi dokumentirani bolesnik imao je 26. godina), a osim AD i cerebrovaskularnih bolesti postoje i mnogi drugi uzroci kako ‘presenilne’ tako i ‘senilne demencije’ ^[27]. Simptomi se dijele u 3 stadija u kojima se izmjenjuju različiti simptomi bolesti od poteškoća u čitanju i govoru do gubitka pamćenja i nemogućnosti obavljanja svakodnevnih funkcija. Postoje i mnogi testovi koji pomažu prilikom dijagnosticiranja bolesti koji se provode bodovanjima ispitanika i svrstavaju u rizične grupe ovisno o rezultatima ispita. AD je sveukupno najčešći (50-70%) oblik demencije u svim zemljama svijeta u kojima je ova bolest detaljno proučavana (a nakon 65 godina starosti AD je uzrokom demencije u više od 80% dementnih bolesnika). Prevalencija varira, ali u prosjeku se može reći da je po učestalosti AD četvrti uzrok smrti u zemljama zapadnog svijeta. Pojavljivanje Alzheimer-ove bolesti također je povezano s genetikom (Obiteljsko pojavljivanje (FAD, od eng. „*familial AD*“)).



Slika 8. Usporedba mozga zdrave osobe i osobe oboljele od Alzheimer-ove bolesti (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://www.alzheimer.hr/ucionica/to-je-to-alzheimerova-bolest/>)

2.3.2. Tay-Sachs- ova bolest

Tay-Sachs-ova bolest je rijetka autosomno recesivna bolest. Uzrokuje progresivno propadanje živčanih stanica, mentalnih i fizičkih sposobnosti, koje počinje oko 7-og mjeseci starosti i obično rezultira smrću u dobi od četiri godine. Bolest se javlja kada se velike količine gangliozida akumuliraju u mozgu živčanih stanica što na kraju dovodi do prerane smrti stanica. Istraživanja u kasnom 20. stoljeću pokazala da Tay-Sachs bolest uzrokovana genetskom mutacijom u hexa genima na 15.-om kromosomu. Tay-Sachs bolest se obično prvo primjećuje u dojenčadi oko 6 mjeseci starosti koja prikazuju abnormalno snažan odgovor na iznenadne zvukove. Također su vidljivi znakovi poput gubitka sluha ili ukočenosti mišića (hipertonija). Bolest je klasificirana u tri oblika koji se razlikuju na temelju starosti neuroloških simptoma ^[28] ^[29]. Maloljetna Tay-Sachs-ova bolest je rjeđa od drugih oblika bolesti, a obično se najprije vidi u djece od dvije do deset godina. Kod osobe s ovim tipom bolesti dolazi do pogoršanja kognitivnih i motornih vještina, disfagije, ataksije i spastičnosti. Smrt se obično javlja u dobi od pet do petnaest godina. Adultna Tay-Sachs-ova bolest je rijedak oblik ove bolesti. Za razliku od drugih oblika, ovaj tip bolesti obično nije smrtonosan. Često se pogrešno dijagnosticira. Od simptoma javljaju se nestabilnost u hodu i progresivno

neurološko propadanje. Simptomi kasno nastupajuće Tay-Sachs – ove bolesti vidljivi su u pubertetu ili ranoj odrasloj dobi, a uključuju poteškoće u govoru i gutanju, nestabilnost hoda, kognitivno propadanje i psihijatrijske probleme (shizofrenija). Tay-Sachs-ova bolest uzrokovana je zbog nedovoljne aktivnosti enzima heksosaminidaze A. Heksosaminidaza A je hidrolitički enzim, pronađena u lizosomima, koji razgrađuje glikolipide. Kada heksosaminidaza A ne radi ispravno, lipidi se akumuliraju u mozgu i ometaju normalne biološke procese ^[30]. Pacijente i nositelje Tay-Sachs-ove bolesti se može identificirati jednostavnim testom krvi koji mjeri aktivnost heksosaminidaze A.

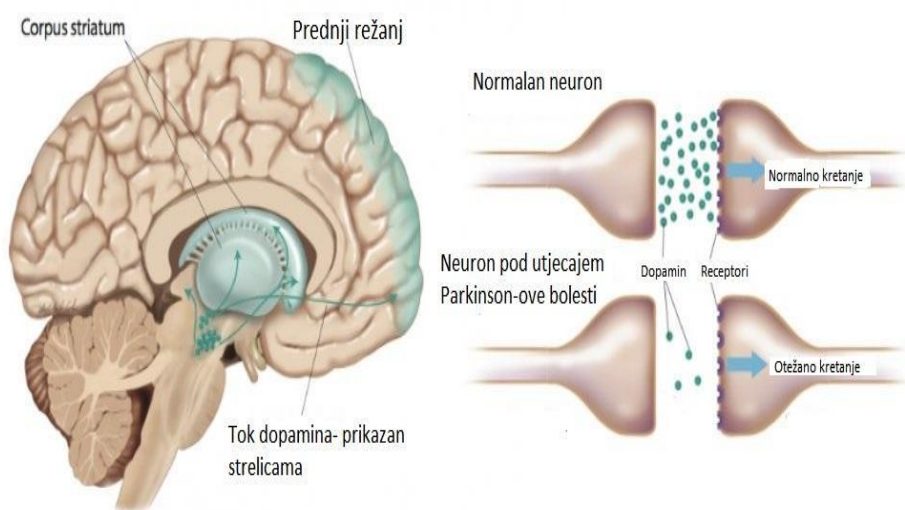
2.3.3. Huntington-ova bolest

Huntington-ova bolest je neurodegenerativni nasljedni poremećaj koji utiče na koordinaciju mišića i dovodi do mentalnog propadanja i karakterističnih simptoma u ponašanju ^[31]. Najraniji simptomi su suptilni problemi s raspoloženjem ili spoznajama, praćeni općim nedostatkom koordinacije i nestabilnim hodom. Bolest se nasljeđuje autosomno dominantno, a simptomi se najčešće očituju u srednjoj životnoj dobi. Dijagnoza se postavlja genetičkim testiranjem. Liječi se simptomatski. Bolest pogađa oba spola podjednako. Razvija se kao posljedica dominantne mutacije na genu IT15, sa kratkog kraka kromosoma 4. U tom genu dolazi do višestrukog ponavljanja tripleta nukleotida CAG (citozin, adenin, gvanin) ^[32] koji kodira ugradnju aminokiseline glutamina u (odgovorni) protein zvani huntingtin. Kod zdravih osoba se ovaj triplet ponavlja od 11 do 28 puta, a kod oboljelih 40 pa čak do 120 puta. Ponavljanje tripleta dovodi do nastanka patološke varijante proteina huntingtina što i uzrokuje oboljevanje od ove bolesti. Simptomi i znakovi bolesti se razvijaju podmuklo, obično počinju u dobi od 35 do 50 godina. Demencija ili psihijatrijski poremećaji (npr. depresija, apatija, iritabilnost, anhedonija, asocijalno ponašanje, bipolarni poremećaj ili shizofrenija) se razvijaju prije ili istodobno s poremećajima pokreta. Pojavljuju se abnormalni pokreti: trzanje udova, živahan hod, nemogućnost obuzdavanja motoričkih radnji kao što su plaženje jezika, grimase lica, ataksija i distonija. Pogoršavanjem poremećaja hod postaje nemoguć, gutanje otežano a demencija izrazita ^[33].

2.2.4. Parkinson-ova bolest

Parkinsonova bolest je bolest poremećaja pokreta zbog smanjenja lučenja kemijske supstancije dopamina u dijelu mozga koji ima važnu ulogu u kontroli voljnih pokreta ^[34] (bazalni gangliji). Postoji pet kliničkih stupnjeva Parkinsonove bolesti (0 - nema znakova

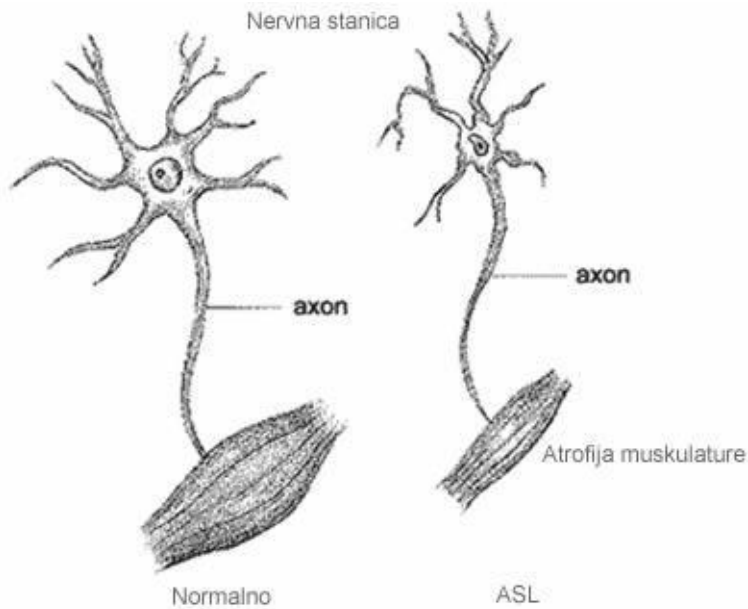
bolesti, 1 - bolest zahvaća jednu stranu tijela, 1,5 - jednostrana + aksijalna zahvaćenost, 2 - zahvaćene obje strane tijela bez poremećaja ravnoteže, 2,5 - blaga obostrana bolest s nesigurnošću, ali i održavanjem položaja pri naglom izbacivanju iz početnog položaja, 3 - blaga do umjerena obostrana bolest s posturalnom nestabilnošću, ali bolesnik je fizički samostalan, 4 - teška onesposobljenost, s tim da je bolesnik još sposoban stajati i hodati bez pomoći, 5 - vezanost uz kolica ili krevet) ^[35]. Simptomi ove bolesti mogu se podijeliti u primarne (drhtanje, ukočenost, usporenost pokreta, slaba ravnoteža, smetnje u kretanju) i sekundarne (depresija, zatvor, problemi gutanja, demencija, seboreja kože i vlasišta, smetnje u govoru, niski krvni tlak, poremećaji u spavanju). Postoje dva tipa ove bolesti: Tip A (Tremor dominantni tip) je blaži oblik bolesti povezan s tremorom i drugim simptomima ograničenim na jednu stranu tijela. Bolesnici odgovaraju jako dobro na uobičajene lijekove kao što je levodopa ^[36] ^[37]. Tip B (Akinetički tip) je nestabilni oblik bolesti s problemom hodanja i malom količinom drhtanja. Umjesto toga, prisutne su poteškoće u hodanju, poteškoće sa držanjem tijela i ravnotežom. Ove osobe mogu imati jako dobar odgovor na lijekove u razdoblju do 8 godina. Liječenje Parkinsonove bolesti provodi se primjenom različitih lijekova (levodopa, bromokriptin, apomorfin, pramipeksol, ropinirol, selegilin, entakapon, amantadin) i medicinskom rehabilitacijom kojoj je cilj maksimalno osposobljavanje za samostalno izvođenje aktivnosti svakodnevnog života kroz adekvatnu edukaciju i programe.



Slika 8. Razlika u količini dopamina kod zdrave osobe i osobe oboljele od Parkinson-ove bolesti rezultira otežanim kretanjem (Slika preuzeta u prilagođena sa <http://novi.ba/clanak/58419/parkinsonova-bolest-neizljeziva-neuroloska-bolest>)

2.2.5. Amiotrofična lateralna skleroza

Amiotrofična lateralna skleroza (ALS) je ozbiljna neurološka bolest koja uzrokuje slabost mišića, invalidnost i na kraju smrt. ALS često počinje s trzanjem mišića i slabosti u ekstremitetima ili nerazgovijetnim govorom. Rani simptomi bolesti uključuju poteškoće s podizanjem prednjeg dijela stopala i prstiju, slabost u nogama, stopalima ili gležnjevima, slabost ili nespretnost ruku, nerazgovijetan govor i otežano gutanje, grčeve mišića i trzanje ruku, ramena i jezika. Bolest često počinje u rukama ili nogama, a zatim se širi na druge dijelove tijela. Kako bolest napreduje mišići postaju progresivno slabiji dok ne dođe do paralize. To na kraju utječe na žvakanje, gutanje, govor i disanje. Živčane stanice koje kontroliraju kretanje mišića postupno odumiru, tako mišići s vremenom progresivno slabe i propadaju ^[38]. Istraživači proučavaju nekoliko mogućih uzroka ALS-a, uključujući mutacije gena i kemijsku neravnotežu ^[39] oko živčanih stanica u spinalnoj tekućini, neorganiziran imunološki odgovor i abnormalne proteine. Bolest je moguće liječiti lijekovima te fizikalnim, radnim i govornim terapijama ^[40]. S obzirom da se amiotrofična lateralna skleroza na može izliječiti, tretmani uglavnom uključuju napore za usporavanje progresije simptoma i povećanje kvalitete života.



Slika 9. Prikaz atrofije mišićnog tkiva osobe oboljele od atrofične lateralne skleroze (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://zdravlje.eu/2011/07/03/amiotroficzna-lateralna-skleroza/>)

3. ZAKLJUČAK

Istraživanja u neurobiologiji zahtijevaju precizne i specifične metode kojima bi se mogle opisati strukture stanica, tkiva, organa, zatim njihovih odnosa sa okolinom i funkcija. Mnogobrojne nove tehnike su razvijene kako bi se doznalo više o fiziologiji, naročito o fiziologiji ljudskog organizma. Funkcionalna snimanja mozga već su nekoliko godina standardne tehnike kojima se mjeri moždana funkcija, ili preciznije, moždana aktivnost u jasno određenim moždanim dijelovima izazvana specifičnim mentalnim funkcijama. Metode funkcionalne neurovizualizacije najčešće se koristi u kognitivnim neuroznanostima, iako može imati i značajnu kliničku upotrebu. U neurobiološkim znanstvenim istraživanjima najviše se koriste citogenetičke i imunohistokemijske metode. Dosadašnje analize i istraživanja neurodegenerativnih bolesti, potpomognute različitim mikroskopskim i biokemijskim istraživanjem, uvelike su pridonijela poboljšanju liječenja bolesnika i smanjenju simptoma, ali ne još i njihovom potpunom nestanku. Znanstvenici vjeruju kako će daljnim istraživanjem različitih imunohistokemijskih metoda doći do otkrivanja novih terapija i spoznaja o degeneracijama na mozgu.

4. LITERATURA

1. "What is Neurodegenerative Disease?". JPND Research. JPND Research. Retrieved February 7, 2015.
2. Bastian FO, Sanders DE, Forbes WA, Hagius SD, Walker JV, Henk WG, Enright FM, Elzer PH; Sanders; Forbes; Hagius; Walker; Henk; Enright; Elzer (2007). "Spiroplasma spp. from transmissible spongiform encephalopathy brains or ticks induce spongiform encephalopathy in ruminants". *Journal of Medical Microbiology*. 56 (9): 1235–1242.
3. Neurobiologija demencije: Uvod u Alzheimerovu i druge neurodegenerativne bolesti moždane kore doc. dr.sci. Goran Šimić, dr. med. Zavod za neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
4. Petrovečki, Kristina Neurobiologija Alzheimerove bolesti i ostalih demencija u usporedbi sa normalnim starenjem.(Neurobiology of Alzheimer disease and other types of aging related dementia)
5. Pollack JR; Perou CM; Alizadeh AA; Eisen MB; Pergamenschikov A; Williams CF; Jeffrey SS; Botstein D; Brown PO (1999). "Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays". *Nat Genet*. 23 (1): 41–46.
6. Eberwine J, et al. Analysis of subcellularly localized mRNAs using in situ hybridization, mRNA amplification, and expression profiling. *Neurochem Res*. 2002;27:1065.
7. Gall, JG; Pardue, ML (June 1969). "Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 63 (2): 378–83
8. Soreq L., Salomonis N., Bronstein M., Greenberg D. S., Israel Z., Bergman H., et al. (2013). Small RNA sequencing-microarray analyses in Parkinson leukocytes reveal deep brain stimulation-induced splicing changes that classify brain region transcriptomes. *Front. Mol. Neurosci*. 6:10 10.3389
9. Ferree TC1, Eriksen KJ, Tucker DM. , Regional head tissue conductivity estimation for improved EEG analysis., *IEEE Trans Biomed Eng*. 2000 Dec;47(12):1584-92.
10. Bartlett, J. M. S.; Stirling, D. (2003). "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". *PCR Protocols. Methods in Molecular Biology*. 226 (2nd ed.). pp. 3–6.

11. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands". *Proc Natl Acad Sci USA*. 93 (13): 9821–9826.
12. Cenchao Shen; Wenjuan Yang; Qiaoli Ji; Hisaji Maki; Anjie Dong; Zhizhou Zhang (2009). "NanoPCR observation: different levels of DNA replication fidelity in nanoparticle-enhanced polymerase chain reactions". *Nanotechnology*. 20: 455103.
13. Ramos-Vara, JA; Miller MA (2014). "When tissue antigens and antibodies get along: revisiting the technical aspects of immunohistochemistry--the red, brown, and blue technique.". *Veterinary Pathology*. 51 (1): 42–87.
14. Raichle, ME (3 February 1998). "Behind the scenes of functional brain imaging: a historical and physiological perspective.". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95 (3): 765–72
15. Townsend, David W. (2008), "Combined PET/CT: the historical perspective", *Semin Ultrasound CT MR*, 29 (4): 232–235
16. Kalender, Willi. *Computed Tomography*. Publicis. 2011. pp.79
17. Carlson, Neil (January 22, 2012). *Physiology of Behavior. Methods and Strategies of Research*. 11th edition. Pearson. p. 151
18. Karl E. Misulis; Toufic Fakhoury (2001). *Spehlmann's Evoked Potential Primer*. Butterworth-heinemann.
19. Regan D (1966). "Some characteristics of average steady-state and transient responses evoked by modulated light". *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 20 (3): 238–48.
20. Regan M.P.; He P.; Regan D. (1995). "An audio–visual convergence area in human brain". *Experimental Brain Research*. 106 (3): 485–7.
21. Catmur C.; Walsh V.; Heyes C. (2007). "Sensorimotor learning configures the human mirror system". *Curr. Biol*. 17 (17): 1527–1531.
22. Niedermeyer E.; da Silva F.L. (2004). *Electroencephalography: Basic Principles, Clinical Applications, and Related Fields*. Lippincot Williams & Wilkins.
23. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (July 2006). "Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein". *J. Neurosci*. 26 (27): 7212–21.
24. Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E (2003). "Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases". *Neuromolecular Med*. 4 (1–2): 21–36.

25. Kohnken R, Buerger K, Zinkowski R, Miller C, Kerkman D, DeBernardis J, Shen J, Mo ller HJ, Davies P, Hampel H. 2000. Detection of tau phosphorylated at threonine 231 in cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 287: 187–190
26. Vila, Miquel; Przedbroski, Serge (May 2003). "Targeting Programmed Cell Death in Neurodegenerative Diseases". *Nature Reviews*. 4: 1–11.
27. Wenk GL (2003). "Neuropathologic changes in Alzheimer's disease". *J Clin Psychiatry*. 64 Suppl 9: 7–10..
28. "Tay–Sachs disease Information Page". National Institute of Neurological Disorders and Stroke. 14 February 2007. Archived from the original on 29 December 2011. Retrieved 10 May 2007.
29. McKusick, Victor A; Hamosh, Ada. "Online Mendelian Inheritance in Man". United States National Institutes of Health. Archived from the original on 29 December 2011. Retrieved 24 April 2009.
30. Osher E, Fattal-Valevski A, Sagie L, Urshanski N, Amir-Levi Y, Katzburg S, Peleg L, Lerman-Sagie T, Zimran A, Elstein D, Navon R, Stern N, Valevski A (March 2011). "Pyrimethamine increases β -hexosaminidase A activity in patients with Late Onset Tay Sachs.". *Mol. Genet. Metab. Molecular Genetics and Metabolism*. 102 (3): 356–63.
31. "Huntington's Disease Information Page: National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS)". NINDS. January 28, 2016. Retrieved 19 July 2016.
32. Squitieri F, Gellera C, Cannella M, et al. (2003). "Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course". *Brain*. 126 (Pt 4): 946–55.
33. "Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of IONIS-HTTRx in Patients With Early Manifest Huntington's Disease - Full Text View - ClinicalTrials.gov". *clinicaltrials.gov*. Retrieved 18 April 2016.
34. Samii A, Nutt JG, Ransom BR (29 May 2004). "Parkinson's disease". *Lancet*. 363 (9423): 1783–1193.
35. Jankovic J (April 2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis". *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*. 79 (4): 368–376.
36. Ceravolo R, Frosini D, Rossi C, Bonuccelli U (December 2009). "Impulse control disorders in Parkinson's disease: definition, epidemiology, risk factors, neurobiology and management". *Parkinsonism Relat. Disord*. 15 (Suppl 4): S111–5.

37. Fahn S (2008). "The history of dopamine and levodopa in the treatment of Parkinson's disease". *Mov. Disord.* 23 (Suppl 3): S497–508
38. Zarei, Sara; Carr, Karen; Reiley, Luz; Diaz, Kelvin; Guerra, Orleiquis; Altamirano, Pablo Fernandez; Pagani, Wilfredo; Lodin, Daud; Orozco, Gloria (2015-11-16). "A comprehensive review of amyotrophic lateral sclerosis". *Surgical Neurology International*. 6: 171.
39. Al-Chalabi A, Leigh PN (August 2000). "Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis". *Current Opinion in Neurology*. 13 (4): 397–405.
40. Carlesi C, Pasquali L, Piazza S, Lo Gerfo A, Caldarazzo Ienco E, Alessi R, Fornai F, Siciliano G (March 2011). "Strategies for clinical approach to neurodegeneration in Amyotrophic lateral sclerosis". *Archives italiennes de biologie*. 149 (1): 151–67.